



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição

Efeito do consumo de Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) na via de regulação da hepcidina modulada pela inflamação e eritropoiese.

LARISSA VALADARES RAMOS

Brasília – DF

2016



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição

Efeito do consumo de Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart) na via de regulação da hepcidina modulada pela inflamação e eritropoiese.

Larissa Valadares Ramos

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Nutrição da
Universidade de Brasília como
requisito parcial à obtenção do Grau
de Nutricionista.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sandra Fernandes Arruda
Colaboração: Msc. Natália Aboudib Campos
Msc. Marcela de Sá Barreto da Cunha

Brasília – DF

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram presentes comigo ao longo desta jornada, em especial a Deus, pela minha vida e pela vida das pessoas que comigo convivem. A toda minha família, especialmente aos meus pais, Nívia e Rondon, meus maiores exemplos e incentivadores. Ao meu irmão, Laércio, pelo companheirismo e amizade.

A orientadora Sandra, por todos os ensinamentos e pelo suporte dado no desenvolvimento deste trabalho. A Natália pelo apoio, paciência e por ter me ensinado a buscar sempre o melhor. A Marcela que tanto me auxiliou e inspirou a gostar da área da pesquisa, sempre com sua constante frase de incentivo “tenha fé”.

A minha colega de laboratório e amiga Júlia, com quem compartilhei as dificuldades e realizações ao longo deste percurso. E a todos outros amigos e colegas que direta ou indiretamente estiveram comigo, me ajudaram, deram palavras de apoio e fizeram parte da minha formação. Muito obrigada!

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só nem nos deixa só; leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada; há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada.”

Antoine de Saint-Exupéri

Resumo

Introdução: O ferro é um elemento essencial aos seres vivos por atuar no transporte de oxigênio, metabolismo energético e síntese de DNA. Porém, por se tratar de um metal de transição, este elemento pode assumir diversos estados de oxidação, e por isso participar de reações de óxido-redução na sua forma livre, podendo causar danos a biomoléculas. A regulação sistêmica deste elemento é mediada pelo hormônio hepcidina, produzido predominantemente pelos hepatócitos. A regulação da expressão da hepcidina é dada pelo *status* de ferro, eritropoiese e resposta inflamatória. Sob condições de eritropoiese estimulada, o aumento da produção e proliferação de eritrócitos, induzidos pelo hormônio eritropoietina (EPO), a hepcidina apresenta sua síntese inibida para que o ferro possa ser disponibilizado das reservas para a produção de hemácias. Sob condições de inflamação ou de infecção, o sistema imunológico libera citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). A IL-6, ao se ligar ao seu receptor na membrana da célula, provoca modificações que promovem a fosforilação do fator de transcrição STAT-3 (Sinal Transdutor e Ativador da Transcrição 3). O STAT3 fosforilado (pSTAT3) migra para o núcleo da célula e promove a transcrição de hepcidina, que por sua vez impede a liberação de mais ferro ao organismo. Os mecanismos da regulação mediada por IL-1 β ainda não estão bem elucidados, mas acredita-se que ao se ligar ao seu receptor na célula, esta citocina também seja capaz de promover a transcrição de hepcidina de forma direta ou por meio da fosforilação das SMADs 1/5/8. Os mecanismos do TNF- α que promovem a transcrição de hepcidina também ainda não foram bem elucidados pela literatura. Alguns estudos revelam que alimentos com alto teor de compostos fitoquímicos são capazes de diminuir a expressão de citocinas mediadoras da inflamação. Esses compostos podem ser encontrados em frutas e hortaliças, como o Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.), um fruto típico do cerrado brasileiro, um alimento com alto teor dessas substâncias. Desta forma, o presente trabalho investigou a hipótese de que o consumo de Tucum-do-Cerrado, em ratos, seria capaz de modular a expressão da hepcidina através das vias da inflamação e da eritropoiese. **Metodologia:** No presente estudo, 32 ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos e receberam o seguinte tratamento dietético: controle (dieta AIN-93G, com 35mg de ferro / kg de dieta), Tucum (dieta AIN-93G, com 35mg de ferro + 150g de Tucum-do-cerrado / kg de dieta), ferro (dieta AIN-93G contendo 350mg de ferro / kg de dieta) e Tucum + ferro (dieta AIN-93G contendo 350mg de ferro / kg dieta + 150g de Tucum-do-Cerrado / kg de dieta). Ao fim de 12 semanas de tratamento os animais foram sacrificados e o intestino, o fígado, o baço e os rins foram removidos para posteriores análises. Quantificou-se a concentração de ferro nos órgãos dos animais por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado. Os níveis de mRNA de Il1b, TNF-a, hamp e Epo foram quantificados por sistema de reação da polimerase em cadeia em tempo real. Os níveis séricos de proteínas pró-inflamatórias foram dosados por ensaio imunoenzimático e os níveis hepáticos de pSTAT3 foram determinados por Western Blot. A análise estatística foi realizada através do software SPSS, com nível de significância $p < 0.05$. **Resultados:** Os níveis de transcritos de hepcidina (Hamp) no fígado dos animais do grupo suplementado com ferro (+Fe) foi significativamente maior que o grupo CT ($p < 0,001$). O tratamento dietético com Tucum-do-Cerrado (Tuc) promoveu diminuição dos níveis hepáticos de Hamp em relação ao grupo controle ($p = 0,001$). A redução dos níveis de transcritos de hepcidina também foi observada na associação do consumo de Tucum-do-Cerrado e suplementação de ferro (Tuc+Fe), em relação ao grupo +Fe ($p < 0,001$). Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis hepáticos de transcritos de Il1b e nos níveis de proteína sérica IL-1 β entre os diferentes tratamentos. No grupo dos animais suplementados com ferro (+Fe) os níveis de pSTAT3 foram maiores que os do grupo controle ($p = 0,002$), enquanto que o tratamento dietético com Tucum-do-Cerrado associado à suplementação de ferro (Tuc+Fe) diminuiu os níveis de pSTAT3 em relação ao grupo ferro ($p = 0,001$), e tornou os níveis semelhantes ao observado no grupo controle. Os níveis renais de transcritos de eritropoietina (Epo) diminuíram no grupo suplementado com ferro e no grupo Tucum-do-Cerrado em comparação ao grupo controle ($p = 0,001$ para ambos), não tendo sido observadas diferenças no grupo que consumiu Tucum-do-Cerrado associado à suplementação de ferro (Tuc+Fe), em relação ao grupo +Fe. **Conclusão:** O consumo de Tucum-do-Cerrado promoveu inibição da transcrição do gene que codifica hepcidina (Hamp). O Tucum-do-Cerrado não alterou os níveis de transcritos hepáticos e proteínas séricas de IL-1 β e TNF-a. Porém, o consumo de tucum-do-cerrado associado à suplementação de ferro diminuiu os níveis de pSTAT3, que está envolvida na ativação da transcrição de Hamp. A via da eritropoiese parece inibida com o consumo de Tucum-do-Cerrado, considerando que há diminuição dos níveis de mRNA de eritropoietina. Concluiu-se no presente estudo que o consumo de Tucum-do-Cerrado, em ratos, é capaz de modular o metabolismo de ferro pelas vias da inflamação.

Palavras-chave: Tucum-do-Cerrado; ferro; inflamação; eritropoiese; hepcidina.

Lista de figuras:

Figura 1. Efeito do consumo do Tucum-do-Cerrado na concentração de ferro nos tecidos de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado.....	27
Figura 2. Níveis de transcritos do gene Hamp de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado.....	28
Figura 3. Níveis de marcadores de inflamação em de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado.....	30
Figura 4. Níveis da proteína pSTAT3 no fígado de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado pela técnica de Western Blotting.....	31
Figura 5. Níveis de transcritos de eritropoietina (Epo) nos rins de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado.....	32

Lista de tabelas:

Tabela 1. Composição da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento.	16
Tabela 2. Efeito do consumo de Tucum-do-Cerrado no ganho de peso corporal, consumo dietético e concentração de ferro da dieta de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado.....	24
Tabela 3. Efeito do consumo de Tucum-do-Cerrado nos parâmetros hematológicos e de ferro sérico de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado.....	25

Lista de abreviaturas:

- **DMT1:** Transportador de metal divalente 1
- **CHCM:** Concentração de hemoglobina corpuscular média
- **CLLF:** Capacidade latente de ligação do ferro
- **CTLF:** Capacidade total de ligação do ferro
- **DcytB:** Enzima Citocromo B Duodenal Redutase
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- **Epo:** Eritropoietina
- **Fe⁺²:** Ferro ferroso
- **Fe⁺³:** Ferro férrico
- **Hamp:** gene da hepcidina
- **Hb:** Hemoglobina
- **HCM:** Hemoglobina corpuscular média
- **HCT:** Hematócrito
- **IL1-b:** Interleucina 1 beta
- **IL-6:** Interleucina 6
- **mRNA:** RNA mensageiro
- **pSTAT3:** STAT3 fosforilada
- **PTL:** Plaquetas
- **RBC:** Eritrócitos
- **STAT3:**
- **Tnfa:** Fator de necrose tumoral alfa
- **VCM:** Volume corpuscular médio
- **WBC:** Células brancas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. OBJETIVO GERAL.....	14
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1. ANIMAIS.....	15
2.4. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	17
2.5. CONCENTRAÇÃO DE FERRO NA DIETA E NOS TECIDOS.....	17
2.6. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS.....	18
2.6.1. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL, ELETROFORESE, PRECIPITAÇÃO COM ACETATO E SÍNTESE DE cDNA.	18
2.6.2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MRNA DOS GENES MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, ERITROPOIESE E METABOLISMO DE FERRO.....	20
2.7. DOSAGEM DE PROTEÍNAS SÉRICAS.....	21
2.8. DOSAGEM DOS NÍVEIS HEPÁTICOS DE STAT 3 FOSFORILADA (pSTAT3).....	22
2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4. CONCLUSÃO.....	33
5. REFERÊNCIAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento essencial aos seres vivos uma vez que atua como cofator de diversas funções fundamentais ao organismo, como transporte de oxigênio, metabolismo energético e síntese de DNA (PANTOPOULOS et al, 2011). O ferro do organismo é obtido pela dieta ou através da reciclagem de eritrócitos senescentes (EVSTATIEV et al, 2012). Na dieta o ferro é encontrado nas formas de ferro hêmico (Fe^{+2} associado a um grupo heme) em alimentos de origem animal, e ferro não-hêmico (Fe^{+3}) em alimentos de origem vegetal (SHILS et al, 2009).

O ferro dietético é absorvido principalmente no duodeno e na porção superior do jejuno. O ferro não-hêmico e o ferro-hêmico são absorvidos por transportadores diferentes, sendo o ferro-hêmico a forma mais biodisponível por ser absorvido diretamente por um carreador transmembrana específico, sem a necessidade de sofrer qualquer modificação (SHILS et al, 2009). O Fe não-hêmico precisa sofrer redução (Fe^{+3} a Fe^{+2}) por ação da enzima citocromo B duodenal (Dcytb) para que então possa entrar na célula por ação do transportador de metal divalente 1 (DMT1), localizado na membrana apical dos enterócitos (EVSTATIEV et al, 2012). No enterócito, o ferro absorvido pode ser utilizado pelo próprio ou pode ser exportado para o plasma ligado à proteína sérica transferrina. A exportação deste mineral pelo enterócito se dá através da proteína ferroportina, único transportador conhecido pelo efluxo de ferro (ZHANG et al, 2013).

Por se tratar de um metal de transição, o ferro pode assumir diversos estados de oxidação, e por isso participar de reações de óxido-redução. Quando em excesso, na sua forma livre, o ferro participa de reações de óxido-redução como as reações de Fenton e Haber-Weiss, levando à produção de radicais livres, que podem causar danos às biomoléculas (SHILS et al, 2009).

Como não há um mecanismo de excreção de ferro, a fim de se evitar esta toxicidade, o organismo possui um rígido controle na homeostase deste mineral (ESTATIEV et al, 2012). Este controle se dá pela regulação intracelular e pela regulação sistêmica. A regulação intracelular acontece por meio de um mecanismo de regulação pós-transcricional de proteínas relacionadas à absorção, armazenamento, transporte e exportação celular de ferro, como as proteínas

denominadas: transportador de metais divalentes-1 (DMT-1), ferritina, transferrina e ferroportina, respectivamente, através do sistema de regulação intracelular IRE-IRP (elemento responsivo ao ferro – proteína ligante de ferro) (HENTZE et al, 2010).

A regulação sistêmica é mediada pelo hormônio peptídico hepcidina, sintetizado, processado e secretado predominantemente pelos hepatócitos (LEMOS, 2010). A hepcidina age ligando-se à ferroportina, internalizando-a e degradando-a, impedindo assim o efluxo deste mineral das células (ZHANG, 2010; NEMETH, 2004).

A expressão de hepcidina é regulada pelo *status* de ferro, envolvendo a via sinalização da proteína morfogenética do osso (BMP6) – hemojuvelina (HJV) e a via do receptor de transferrina (TfR) – proteína da hemocromatose (HFE) (ESTATIEV et al, 2012). Além da concentração de ferro no organismo, a expressão de hepcidina também é mediada pela resposta inflamatória. Sob condições de inflamação ou de infecção, o sistema imunológico libera citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (PORTO et al, 2012; VITALE et al, 2007). A IL-6, ao se ligar ao seu receptor na célula hepática, provoca modificações que promovem a fosforilação do fator de transcrição STAT-3 (Sinal Transdutor e Ativador da Transcrição 3). O STAT3 fosforilado (pSTAT3) migra para o núcleo da célula e promove a transcrição do gene da hepcidina, que por sua vez impede a liberação de mais ferro ao organismo. Os mecanismos da regulação mediada por IL-1 β ainda não estão bem elucidados, mas acredita-se que ao se ligar ao seu receptor celular, esta citocina também seja capaz de promover a transcrição de hepcidina de forma direta ou por meio da fosforilação das SMADs 1/5/8. Um estudo mais recente revela que possa haver uma conexão indireta entre a via da IL-1 β e a via de sinalização da BMP na ativação da transcrição de hepcidina (ZHANG et al, 2012; ANDERSON et al, 2007; SHANMUGAN et al, 2015). Os mecanismos do TNF- α que promovem a transcrição de hepcidina ainda não foram muito bem esclarecidos pela literatura (PORTO et al, 2012; PINTO et al, 2010).

Outro fator que modula a expressão da hepcidina é a eritropoiese. Sob condições de eritropoiese estimulada, com aumento da produção e proliferação de eritrócitos, induzidos pelo hormônio eritropoietina (EPO), a hepcidina apresenta

síntese inibida (HAASE et al, 2012). O mecanismo pelo qual a hepcidina é inibida pela EPO não está totalmente elucidado, mas sugere-se que não aconteça de maneira direta (GAMMELLA et al, 2015). Em condições de baixa tensão de oxigênio, como em situações de hipóxia, há indução da síntese de EPO, que age na medula óssea provocando a diferenciação e proliferação de eritrócitos. Os estudos mais recentes sugerem que alguns fatores solúveis produzidos pelos precursores de eritrócitos como o fator de diferenciação do crescimento 15 (GDF-15), a proteína TWSG1 (*twisted gastrulation protein 1*) e a eritroferone promovam diminuição da indução da expressão de hepcidina (TANNO et al, 2009; GAMMELLA et al, 2015).

Alguns estudos revelam que alimentos com alto teor de fitoquímicos são capazes de diminuir a expressão de citocinas mediadoras da inflamação (KIM et al, 2013; KAUNTZ et al, 2012). Mais de cinco mil fitoquímicos já foram identificados, porém suas ações ainda são pouco estudadas. Dentre os fitoquímicos conhecidos os principais são a classe dos compostos fenólicos, que abrange compostos como os flavonoides, estilbenos, cumarinas e taninos (FERREIRA et al, 2007).

Esses compostos podem ser encontrados em frutas e hortaliças, como o Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.), um fruto típico do cerrado brasileiro (LIU, 2013; SIQUEIRA et al, 2013). Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa revelou que o Tucum-do-Cerrado possui alto teor de fitoquímicos quando comparado a outros doze frutos nativos do cerrado (SIQUEIRA et al, 2013). Em um estudo recente, o qual avaliou o efeito protetor deste fruto contra o estresse oxidativo em modelo *in vitro*, observou-se que o extrato do Tucum-do-Cerrado foi capaz de captar espécies reativas de oxigênio e reduzir danos celulares (SCHUELTER et al, 2016). O consumo deste fruto é capaz de reduzir o estresse oxidativo gerado por acúmulo de ferro excessivo no organismo, por meio da diminuição da biodisponibilidade deste no fígado e consequente modulação de certos genes envolvidos na regulação desse micronutriente (FUSTINONI-REIS et al, 2016). Desta forma, o presente trabalho avaliou o efeito do consumo de Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart) na via de regulação da hepcidina modulada pela inflamação e eritropoiese, em ratos.

OBJETIVO

1.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do consumo de Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa Mart*) na via de regulação da hepcidina modulada pela inflamação e eritropoiese.

1.2. Objetivos específicos

- Quantificar a concentração de ferro no fígado, intestino, baço e nos rins de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado.
- Dosar os níveis de mRNA de interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), hepcidina (Hamp) no fígado e de eritropoietina nos rins de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado.
- Dosar níveis hepáticos da proteína STAT3 fosforilada (pSTAT3) de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado.
- Determinar o estado inflamatório dos animais por meio da avaliação das concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

32 ratos Wistar machos de 25 dias de idade foram tratados no biotério da Faculdade de Ciências da Saúde, na Universidade de Brasília. Empregou-se ciclo de luz / escuridão de 12/12h, temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, livre acesso à água e dieta padrão para roedores em crescimento AIN – 93G (REEVES et al, 1993) ofertada de 16h às 8h. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB, UnBDoc nº 20855/2014.

2.2. Protocolo experimental

Ao fim de quatro semanas de aclimação com dieta padrão para roedores em crescimento, os ratos foram divididos em quatro grupos experimentais (8 animais em cada grupo) e receberam as seguintes dietas:

- **Controle (CT):** Dieta AIN-93G, com 35mg de ferro / kg de dieta;
- **Ferro (Fe):** Dieta AIN-93G contendo 350mg de ferro / kg de dieta;
- **Tucum (Tuc):** Dieta AIN-93G, com 35mg de ferro + 150g de Tucum-do-cerrado / kg de dieta;
- **Tucum + Ferro (Tuc+Fe):** Dieta AIN-93G contendo 350mg de ferro / kg dieta + 150g de Tucum-do-Cerrado / kg de dieta.

As quantidades de macronutrientes da dieta advindas com o Tucum-do-Cerrado foram ajustadas com o intuito de adequar estes nutrientes de acordo com as recomendações previstas na dieta AIN-93G para roedores (REEVES et al., 1993). A quantidade de Tucum-do-Cerrado utilizada no estudo (150g de fruto para cada quilograma de dieta) foi embasada na recomendação de cinco porções diárias de frutas e hortaliças para adultos saudáveis, especificadas no Guia Alimentar para a População Brasileira (BRASIL, 2008), seguindo a proporção entre a quantidade total de alimento ingerida por um indivíduo adulto ao longo do dia e a quantidade ingerida por um rato adulto no dia. A dose de suplementação de ferro fornecida foi dez vezes

maior que a recomendada para roedores. Esta quantidade foi baseada na dose de suplementação utilizada em seres humanos adultos, que é aproximadamente dez vezes superior à Ingestão Dietética Recomendada (RDA).

As rações dos animais foram preparadas mensalmente a partir da mistura dos ingredientes (Rhoister, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil) de acordo com a proporção dos ingredientes proposta por Reeves et al. (1993), descritas na tabela 1. Ao fim do preparo, as rações foram armazenadas a -20°C.

Tabela 1. Composição da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento.

Ingrediente	g/Kg de dieta
Amido de milho	397,5
Caseína (proteína >85%)	200,0
Amido dextrinizado (tetrassacarídeo 90-94%)	132,0
Sacarose	100,0
Óleo de soja (sem aditivos)	70,0
Fibra	50,0
Mix mineral	35,0
Mix vitamínico	10,0
L-cistina	3,0
Bitartarato de colina (colina 41,1%)	2,5
Terc-butil hidroquinona	0,014

Fonte: (REEVES et al., 1993)

Ao fim de 12 semanas de tratamento, os animais foram anestesiados com isoflurano em câmara anestésica, seguida de punção cardíaca. O intestino, o fígado, o baço e os rins foram removidos e lavados em solução salina (NaCl, 0,9%) a 4°C, imediatamente congelados em nitrogênio líquido (N₂) e estocados a -80°C para posteriores análises. O sangue foi coletado em dois tubos, um sem e outro com EDTA 7% (21µL / mL sangue).

2.3. Consumo de dieta e ganho de peso

O consumo da dieta foi mensurado diariamente por meio da diferença entre a quantidade de dieta ofertada e a quantidade de sobras. Os ratos foram pesados semanalmente em balança analítica (Marte, ASF11, São Paulo, SP, Brasil) para avaliação ponderal, antes de receberem a ração.

2.4. Parâmetros hematológicos

O sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos de 1,5mL com EDTA 7% (21 μ L / mL sangue) para análise de células brancas. Após a coleta, os testes foram realizados no Hospital Veterinário de Brasília utilizando o contador de células ABX Micros ESV 60 (Horiba, Kyoto, Japão) com parâmetros definidos para ratos. Foram determinados os seguintes parâmetros eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas (PTL) e células brancas (WBC).

2.5. Concentração de ferro na dieta e nos tecidos

A concentração de ferro no fígado, baço, intestino, rim e nas dietas foi quantificada por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado (ICP/AES, Spectro, Kleve, Alemanha), de acordo com o método descrito por Baranowska, Czernicki e Aleksandrowicz (1995), com modificações.

Amostras de fígado (0,3 g), de baço (0,1 g), de intestino (0,4 g), de rim (0,4 g) e de ração (0,5 g) foram digeridas com 5 mL HNO₃ PA (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) e 2,5 mL H₂SO₄ PA (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) em sistema biodigestor micro-ondas Provecto Analítica (DGT 100 Plus; Provecto Analítica, Jundiaí, São Paulo, Brasil), utilizando-se o seguinte programa: 5 min – 330 W; 6 min – 700 W ; 1 min – 800 W; 20 min – 0 W (resfriamento). Após a digestão, as amostras foram ressuspendidas em HNO₃ 0,1 mol/L para um volume final de 25 mL. A concentração de ferro nas amostras foi determinada por espectrometria de emissão atômica (ICP-AES; Spectro, Kleve, Alemanha), linha 238 nm, utilizando curva de calibração com Fe (Titrisol-Merck) no intervalo de 0 a 10 ppm. Os resultados foram expressos em μ g de ferro por g de tecido. A exatidão do método para quantificação de ferro foi determinada utilizando uma amostra de referência (Rice Flour, SRM 1658a, United States Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, EUA), analisada em triplicata. Todas as vidrarias utilizadas nas análises foram lavadas com HCl 10% e em seguida lavadas com água deionizada (sistema Milli-Q, Millipore Corporation).

2.6. Determinação dos níveis de transcritos

2.6.1. Extração de RNA Total, Eletroforese, Precipitação com Acetato e Síntese de cDNA.

A extração de RNA total do fígado e rim dos animais foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA): 0,1g de tecido foi homogeneizado em TRIzol® (1 mL para cada 0,1 g de tecido), utilizando homogeneizador elétrico TissueRuptor (QIAGEN, Austin, Texas, EUA) com as amostras imersas em gelo, seguida de centrifugação a 10000 x *g* a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo, no qual 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram adicionados seguido de incubação por 3 minutos à temperatura ambiente e posterior centrifugação a 10000 x *g* a 4°C por 10 min, para separação da fase orgânica e fase aquosa. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo no qual 500 µL de álcool isopropílico (J. T. Baker, Xalostoc, Edo de Méx, México) foram adicionados para a precipitação do RNA, seguida de centrifugação a 10000 x *g* a 4°C por 10 min. O pellet de RNA foi lavado com 1 mL etanol 75% (J. T. Baker, Xalostoc, Edo de Méx, México), para remoção de impurezas, seco à temperatura ambiente, ressuspendido em água deionizada e estocados a -80°C.

As amostras de RNA foram precipitadas com acetato de sódio anidro 3 mol/L e pH 5,2 (0,1 x volume da amostra) e etanol (2,5 x volume da amostra), incubadas a uma temperatura de 4° C por 30 min e centrifugadas a 10.000 x *g* por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao precipitado 1 mL de etanol 75% a 4°C seguido de centrifugação a 10.000 x *g* por 5 min a 4°C e descarte do sobrenadante. O material foi seco a temperatura ambiente e posteriormente ressuspendido em água deionizada.

A determinação da concentração de RNA total foi realizada através de leitura em espectrofotômetro a 260nm (UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japão), e dada pela fórmula:

$$\text{Concentração de RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \times \text{fator de diluição}.$$

Na qual, A₂₆₀ é valor de leitura da amostra a 260 nm, 40 é o coeficiente médio de extinção do RNA (AZEVEDO et al, 2010).

O grau de pureza das amostras de RNA foi avaliado por espectrofotometria através do cálculo entre a razão das absorbâncias a A_{260}/A_{280} nm para verificação de contaminação com proteínas e A_{260}/A_{230} nm para verificação de contaminação com compostos fenólicos. Foram considerados como adequados valores das razões maiores ou iguais que 1,8 (AZEVEDO et al, 2010).

A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, no qual uma alíquota de 300 ng foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil), tampão de corrida TAE 1x (Tris: Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil / Ácido Bórico: Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil / Ácido Etilenodiaminotetracético: Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e corado com 5 μ L GelGreen™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). O gel foi analisado com auxílio do software do sistema de fotodocumentação L – Pix HE Image (Loccus Biotecnologia, SP, Brasil) para confirmar ausência de material genético degradado.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizando utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Um mix 2x foi preparado, contendo 10X RT Buffer, 10X Random primers, dNTPmix, RNase inhibitor e MultiScribe™ Reverse Transcriptase, com volume final de 10 μ L, e posteriormente adicionado a um tubo contendo 10 μ L de amostra de RNA (na concentração 0,2 μ g/ μ L). Para a realização da transcrição reversa foi utilizado termociclador (Esco, Swift Maxi, Hatboro, PA, EUA) aplicando-se os seguintes parâmetros: 25°C por 10 min; 37°C por 120 min; 85°C por 5 min. Ao final da reação as amostras de cDNA foram estocadas a uma temperatura de -20°C para posterior utilização. Uma reação de síntese de cDNA sem a enzima transcriptase reversa foi realizada para cada amostra como controle negativo. Uma alíquota destas amostras foi submetida à reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) para averiguar a ausência de contaminação por DNA genômico.

2.6.2. Determinação dos níveis de mRNA dos genes marcadores de inflamação, eritropoiese e metabolismo de ferro.

As concentrações de mRNA dos genes marcadores de inflamação no fígado – interleucina-1 beta (Il1b) e fator de necrose tumoral alfa (Tnfa)–, marcador da

eritropoiese no rim – eritropoietina (Epo) - e marcador de metabolismo de ferro – hepcidina (Hamp) no fígado, foram determinadas pela amplificação através do sistema de reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR; StepOne Plus Real Time PCR System, Applied Biosystems, Cingapura).

A qPCR foi realizada utilizando 2 µL de cDNA (correspondendo a cerca de 0,02 µg de RNA total), 5 µL de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,2 µmol/L (concentração final) de cada primer (tabela 2), com volume final de 10 µL. A amplificação do gene de interesse foi realizada empregando-se um sistema de reação de 50 ciclos (desnaturação: 95°C por 20 s; hibridação: 95°C por 3 s e 60°C por 30 s; estágio da curva de dissociação: 95°C por 15 s, 60°C por 60 s, 95°C por 15 s e 60°C por 15 s). A especificidade de cada produto amplificado foi verificada à partir da curva de dissociação.

Para determinar a eficiência das reações, foram construídas curvas-padrão de cada gene de interesse a partir do valor do ciclo de amplificação (C_T) versus log da concentração de cDNA e a eficiência será quantificada a partir do valor do coeficiente angular da reta, através da equação:

$$E (\%) = (10^{-1/\text{inclinação}} - 1) \times 100$$

na qual, E corresponde à eficiência da reação, e a inclinação corresponde ao valor do coeficiente angular da reta. A eficiência da qPCR foi considerada válida entre 90 a 110%.

Uma outra curva foi construída utilizando-se os valores de ΔC_T (C_T gene de interesse - C_T gene constitutivo) versus o log das diluições de cDNA em unidades arbitrárias, para cada gene de interesse; para validação destas curvas, o valor de coeficiente angular da reta foi considerado válido quando menor ou igual a 0,1. A validação foi realizada segundo o tutorial “Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR” (Part #: 4371095 Rev B, Applied Biosystems). A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método do $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A expressão dos genes foi calculada utilizando os valores do C_T e os resultados de expressão gênica foram expressos como o número de vezes expresso em relação ao controle endógeno. Os genes de

IL1 β , Tnf α e a Epo foram feitos em triplicata e o de IL6 foi feita em quadruplicata. Todas foram normalizadas em relação ao gene constitutivo β -actina (Actb).

2.7. Dosagem de proteínas séricas

As dosagens dos níveis séricos de IL-1 β e TNF- α foram determinadas utilizando kits comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISA; Bender MedSystems, Vienna, Austria). As microplacas foram incubadas *overnight*, a 4° C, com 25 μ L de anticorpo de captura/ poço, para máxima sensibilização. Após essa incubação, o conteúdo da microplaca foi descartado e as microplacas foram lavadas cinco vezes com 150 μ L com tampão de lavagem (PBS 1x + Tween 20 0,05%). Posteriormente, 25 μ L de padrão de IL-1 β , TNF- α ou de soro e foram adicionados e as microplacas seladas e incubadas *overnight*, a 4° C. Em seguida, as microplacas o conteúdo da microplaca foi descartado e as microplacas e a etapa de lavagem foi realizada novamente. Em seguida, 25 μ L de anticorpo de detecção conjugado a biotina/poço foram adicionados e as microplacas incubadas a temperatura ambiente por 1h. As microplacas foram novamente lavadas cinco vezes com tampão de lavagem, seguido de incubação com 25 μ L/poço de enzima (Avidin-HRP), com incubação por 30 min a temperatura ambiente. Novamente as microplacas foram lavadas e a cada poço foram adicionados 25 μ L de substrato (solução de tetrametilbenzidina - TMB), com posterior incubação à temperatura ambiente por cerca de 10 min. A reação foi interrompida com a adição de 100 μ L de solução de parada (H₃PO₄ 1 mol/L) e as absorbâncias das amostras foram determinadas a 450 nm utilizando-se uma leitora de microplaca (SurinseTecan, Seestrasse, Männedorf, Suíça). Para determinação da concentração de cada citocina foi construída uma curva de calibração de seis pontos com padrões específicos.

2.8. Dosagem dos níveis hepáticos de STAT 3 fosforilada (pSTAT3)

Os níveis hepáticos de STAT 3 fosforilada (pSTAT3) foram determinados por Western Blotting. 0,2g de tecido foi homogeneizado com 400 μ L de tampão de homogeneização (composto por sacarose 0,25 mol/L, Tris HCl 15mmol/L pH 7,9,

NaCl 15mmol/L, KCl 60mmol/L, EDTA 5mmol/L, Spermine 0,15mmol/L, Spermidine 0,5mmol/L e Dithiotheritol 1mmol/L), 40µL de PMSF e 10µL de coquetel inibidor de protease, centrifugados a 12.000 x *g* por 10 min, a 4° C. O sobrenadante foi recolhido e estocado a -80°C para posteriores análises. As concentrações de proteína total de cada extrato de proteína foram determinadas pelo método de Lowry, modificado por Hartree (1972). Cem microgramas de proteína foram adicionados e separados por SDS-PAGE de 5% e 12% e em seguida transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno de 0,45 µm (membrana de transferência Immobilon®-P - IPVH00010 - Millipore - Billerica MA, EUA). Após esta etapa as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio (TBS, 0,1% de Tween 20 e leite em pó desnatado 5%), por 2h, e depois incubadas com anticorpo primário, com diluição de 1:500 para pSTAT3 e 1:1000 para Actb, *overnight* à 4°C, em agitador basculante com velocidade mediana.

Após o período de incubação as membranas foram lavadas com TBS-T 0,1% três vezes e sensibilizadas por 1h com o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina diluído em 1:1000. Posteriormente as membranas foram lavadas três vezes em TBS-T 0,1% e as bandas foram visualizadas por solução BCIP® / NBT (B6404 - Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) e quantificadas com sistema de análise de imagem Image Studio Lite (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA).

2.9. Análise estatística

Para avaliação da normalidade dos dados foi utilizado teste Kolmogorov-Smirnov. Para realizar as comparações entre os tratamentos foi utilizado teste de comparações múltiplas (ANOVA) com correção de Bonferroni, utilizando o software SPSS (versão 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), com nível de significância de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora o metabolismo de ferro seja finamente regulado, o consumo excessivo de ferro pode levar a uma sobrecarga deste micronutriente no organismo, levando a uma série de danos às biomoléculas. A fim de controlar o equilíbrio sistêmico deste micronutriente, a hepcidina, principal hormônio regulador da homeostase de ferro, tem papel fundamental no controle do efluxo deste elemento das células. A regulação da hepcidina é mediada principalmente pelo *status* de ferro no organismo, inflamação e eritropoiese (EVSTATIEV e GASCHÉ, 2012).

Além do controle da mobilização do ferro a partir dos tecidos, os efeitos deletérios do ferro consumido em excesso podem ser diminuídos pela ligação deste micronutriente a alguns compostos de baixo peso molecular passíveis de serem encontrados em frutas e hortaliças, como os polifenóis (BACCAN *et al*, 2012). Esses compostos têm como principais características as ações antioxidantes e anti-inflamatórias e a regulação da expressão de genes (CARDOZO *et al*, 2013; LIU, 2013). No presente estudo os animais tiveram suas dietas suplementadas com ferro, associadas ou não ao Tucum-do-Cerrado, um fruto rico em compostos polifenóis.

Ao final de 12 semanas de tratamento não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso corporal e no consumo dietético entre os grupos (Tabela 2). O mesmo resultado pode ser encontrado no estudo de Fustinoni-Reis *et al* (2016) no qual ratos Wistar machos suplementados com ferro também não tiveram alterações no ganho de peso corporal. Conforme esperado, as concentrações de ferro das dietas dos animais do grupo Fe e do grupo Tuc+Fe tinham uma quantidade deste micronutriente significativamente maior que a dieta do grupo CT ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente), portanto os animais destes grupos consumiram mais ferro que os demais (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito do consumo de Tucum-do-Cerrado no ganho de peso corporal, consumo dietético e concentração de ferro da dieta de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado.

	CT	Fe	Tuc	Tuc+Fe
Ganho de peso corporal (g)	218,70 ± 29,22	223,80 ± 26,80	195,30 ± 31,41	197,22 ± 39,78
Consumo de ração (g/ 12 semanas)	1558,60 ± 106,82	1642,00 ± 89,55	1534,68 ± 73,72	1604,72 ± 188,86
[Fe] na dieta (µg/g)	24,24 ± 4,78	214,61 ± 50,76 *	28,69 ± 4,75	216,65 ± 35,21*

CT, grupo tratado com dieta controle AIN-93G; + Fe, grupo tratado com dieta AIN-93G contendo 350 mg/Kg de ferro; Tuc, dieta AIN-93G acrescida de 15% de Tucum-do-Cerrado; Tuc + Fe, dieta AIN-93G acrescida de 15% de Tucum-do-Cerrado contendo 350 mg/Kg de ferro. Os dados correspondem a média ± desvio-padrão ($n = 8$). * Diferenças estatísticas em relação ao grupo CT, ($p < 0,05$).

O *status* de ferro no organismo é refletido pelos parâmetros séricos e pela sua concentração nos tecidos. No plasma o ferro é transportado pela proteína transferrina a qual se encontra mais saturada quando os níveis séricos de ferro aumentam, já que esta precisa ligar-se à mais íons ferro. Consequentemente tem-se redução na capacidade de ligação dessa proteína ao ferro e maior saturação da transferrina (SHILS et al, 2009). Ao final das 12 semanas de tratamento a concentração de ferro sérico e a saturação de transferrina dos animais suplementados com ferro (+Fe) foram significativamente maiores comparados ao grupo CT ($p = 0,031$ e $p = 0,022$, respectivamente; Tabela 3), e consequentemente a capacidade de ligação latente de ferro (CLLF) menor ($p = 0,013$; Tabela 3).

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Fustinoni-Reis et al (2016). Ratos suplementados com ferro por 30 dias também apresentaram maior porcentagem de saturação de transferrina em relação ao grupo controle. Entretanto, neste mesmo estudo, o consumo de Tucum-do-Cerrado associado a suplementação de ferro promoveu diminuição dos níveis de Fe sérico e saturação de transferrina em relação ao grupo suplementado com ferro, resultado diferente do encontrado no presente estudo, uma vez que não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros séricos de ferro entre os animais do grupo +Fe e do grupo Tuc+Fe.

Em relação aos parâmetros hematológicos (Tabela 3), os animais que consumiram Tucum-do-Cerrado (Tuc) apresentaram maiores níveis de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) quando comparados aos animais do grupo CT ($p = 0,028$). O mesmo foi observado na associação da suplementação de ferro e Tucum-do-Cerrado (Tuc+Fe) em relação ao grupo +Fe: maiores níveis de hemoglobina corpuscular média (HCM) e CHCM ($p = 0,003$ e $p < 0,001$, respectivamente).

As células brancas desempenham importante papel no sistema imune, já que fazem parte dos mecanismos de defesa do organismo. Sob condições de infecção os níveis plasmáticos destas células encontram-se aumentados (CUPPARI et al, 2002). No presente estudo os animais não apresentaram diferença estatística em relação aos níveis de células brancas entre os diferentes tratamentos, indicando ausência de quadro de infecção (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do consumo de Tucum-do-Cerrado nos parâmetros hematológicos e de ferro sérico de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado.

	CT	Fe	Tuc	Tuc+Fe
Ferro sérico ($\mu\text{g/dL}$)	107,68 \pm 5,85	202,46 \pm 78,42*	142,17 \pm 32,98	177,60 \pm 42,02
CLLF ($\mu\text{g/dL}$)	286,18 \pm 59,85	199,64 \pm 41,21*	256,15 \pm 20,93	260,98 \pm 37,59
CTLF ($\mu\text{g/dL}$)	405,67 \pm 48,94	380,64 \pm 74,93	398,32 \pm 45,08	438,58 \pm 30,92
Sat transf (%)	26,77 \pm 3,76	45,77 \pm 14,73*	37,13 \pm 3,16	40,40 \pm 8,50
Tf (mg/dL)	283,97 \pm 34,26	266,45 \pm 52,45	278,82 \pm 31,55	307,01 \pm 21,64
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7,95 \pm 0,63	7,84 \pm 0,60	7,77 \pm 0,60	7,29 \pm 0,48
Hemoglobina (g/dL)	15,07 \pm 0,94	14,77 \pm 0,31	15,29 \pm 0,95	15,19 \pm 1,10
Hematócrito (%)	42,88 \pm 1,03	41,28 \pm 1,35	42,50 \pm 1,50	40,50 \pm 1,66
VCM (fl)	55,00 \pm 0,89	54,83 \pm 0,75	54,16 \pm 0,75	55,00 \pm 1,00
HCM (pg)	18,95 \pm 0,39	19,14 \pm 0,19	19,74 \pm 0,11	20,58 \pm 0,98 [§]
CHCM (g/dL)	34,82 \pm 0,49	35,11 \pm 0,42	36,17 \pm 0,63 *	37,53 \pm 1,24 [§]
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	590,08 \pm 56,53	544,08 \pm 85,26	524,17 \pm 16,68	589,10 \pm 48,06
Células brancas	4,88 \pm 2,54	4,89 \pm 1,53	4,26 \pm 1,31	5,24 \pm 1,24

(x10³/μL)

CT, grupo tratado com dieta controle AIN-93G; + Fe, grupo tratado com dieta AIN-93G contendo 350 mg/Kg de ferro; Tuc, dieta AIN-93G acrescida de 15% de Tucum-do-Cerrado; Tuc + Fe, dieta AIN-93G acrescida de 15% de Tucum-do-Cerrado contendo 350 mg/Kg de ferro. Os dados correspondem a média ± desvio-padrão ($n = 8$). * Diferenças estatísticas em relação ao grupo CT [§]Diferença estatística comparado ao grupo +Fe ($p < 0,05$).

O fígado caracteriza-se como o principal local de armazenamento de ferro do organismo, onde este mineral é estocado associado à proteína ferritina. O baço tem importante participação no metabolismo de ferro por ser o órgão responsável pela reciclagem de eritrócitos, portanto o aumento na concentração de ferro nesse órgão pode ser dado principalmente pela quantidade de hemácias (SHILS et al, 2009; PAPANASTASIOU et al, 2000).

A figura 1 mostra a concentração de ferro no baço, fígado, intestino e rins dos animais dos diferentes grupos de tratamento. O consumo dietético de ferro dez vezes maior que a recomendação de ferro pra roedores (+Fe) promoveu aumento da concentração de ferro no fígado ($p = 0,032$; Figura 1 – A), no baço ($p = 0,007$; Figura 1 – B) e no intestino ($p < 0,001$; Figura 1 – C), em comparação ao grupo CT. No rim não foram observadas diferenças significativas na concentração de ferro. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Dongiovanni (2013) et al e de Gao (2014) et al, nos quais ratos suplementados com ferro tiveram estoques hepáticos deste micronutriente aumentados.

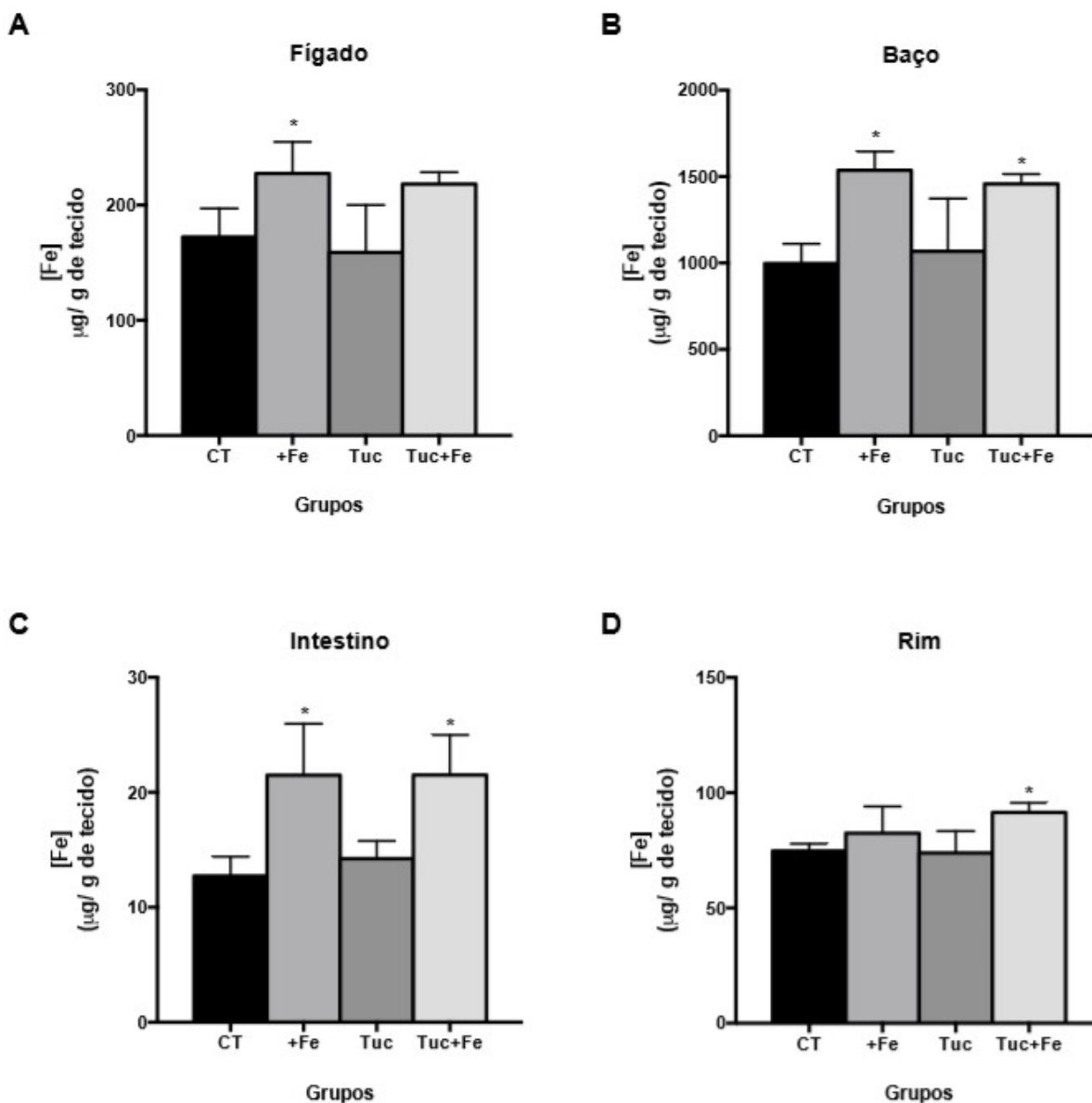


Figura 1. Efeito do consumo do Tucum-do-Cerrado na concentração de ferro nos tecidos de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado. *Diferença estatística em relação ao grupo CT ($p < 0,05$). (One-way ANOVA seguido por teste post-hoc Bonferroni).

O tratamento com Tucum-do-Cerrado (Tuc) não alterou a concentração de ferro total nos tecidos. A associação do Tucum-do-Cerrado com a suplementação de ferro (Tuc+Fe) não foi capaz de reduzir o acúmulo deste micronutriente no baço, intestino e rins ($p = 0,016$, $p < 0,001$ e $p = 0,018$, respectivamente), em relação ao grupo CT. Semelhante ao encontrado no presente estudo, Siqueira et al (2012) observaram que o consumo da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vog), alimento rico em compostos

fitoquímicos, alterou os níveis de ferro nos tecidos quando associado à suplementação de ferro.

Como a hepcidina, proteína codificada pelo gene *Hamp*, é um regulador negativo do metabolismo de ferro, sob condições de sobrecarga de ferro, este hormônio é secretado a fim de controlar os níveis sistêmicos deste mineral no organismo, limitando tanto a absorção quanto a liberação de ferro dos tecidos (GROTTO, 2008). Ao final do tratamento, observou-se que os níveis de transcritos de hepcidina (*Hamp*) no fígado dos animais do grupo suplementado com ferro (+Fe) foi significativamente maior que o grupo CT ($p < 0,001$; Figura 2). Os altos níveis de hepcidina no grupo ferro estão de acordo com o resultado da concentração de ferro no fígado.

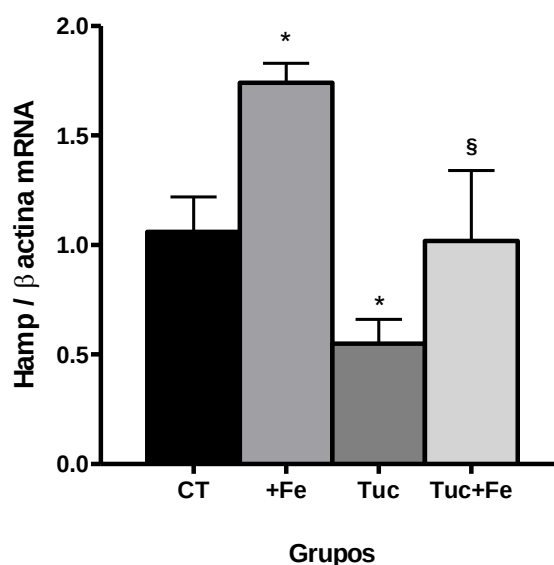


Figura 2. Níveis de transcritos do gene *Hamp* no fígado de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado. *Diferença estatística em relação ao grupo CT. § Diferença estatística em relação ao grupo +Fe.

O tratamento dietético com Tucum-do-Cerrado (Tuc) promoveu diminuição dos níveis hepáticos de *Hamp* em relação ao grupo controle ($p = 0,001$; Figura 1). A redução dos níveis de transcritos de hepcidina também foi observada na associação do consumo de Tucum-do-Cerrado e suplementação de ferro (Tuc+Fe), em relação ao grupo +Fe ($p < 0,001$), corroborando com a hipótese de que o Tucum-do-Cerrado possui um

potencial efeito inibidor da transcrição de hepcidina. A associação da suplementação de ferro com o consumo de Tucum-do-Cerrado tornou os níveis hepáticos de mRNA de Hamp semelhantes aos do grupo controle. No estudo de Mu et al (2014) também foi observado que o tratamento com extrato da casca de semente de soja preta (rico em fitoquímicos) foi capaz de reduzir a expressão de Hamp no fígado, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, independente de uma maior oferta de ferro.

Sabendo que compostos fitoquímicos também podem regular genes relacionados à inflamação (CARDOZO *et al.*, 2013; LIU, 2013) e que a inflamação pode regular a expressão de hepcidina (PORTO et al, 2012; VITALE et al, 2007), foi investigado no presente estudo, se o efeito do consumo de Tucum-do-Cerrado na diminuição da hepcidina está relacionado à inflamação.

Ao final de 12 semanas de tratamento não foram encontradas diferenças significativas nos níveis hepáticos de transcritos de Il1b e nos níveis de proteína sérica IL-1 β entre os diferentes tratamentos (Figura 3 A e B). Com relação ao outro marcador da inflamação, o TNF- α , os níveis hepáticos de transcritos do gene que codifica esta proteína (Tnfa) também não se encontraram alterados, embora a sobrecarga dietética de ferro tenha provocado aumento significativo dos níveis séricos de TNF- α , quando comparado ao grupo CT ($p = 0,039$; Figura 3 C e D).

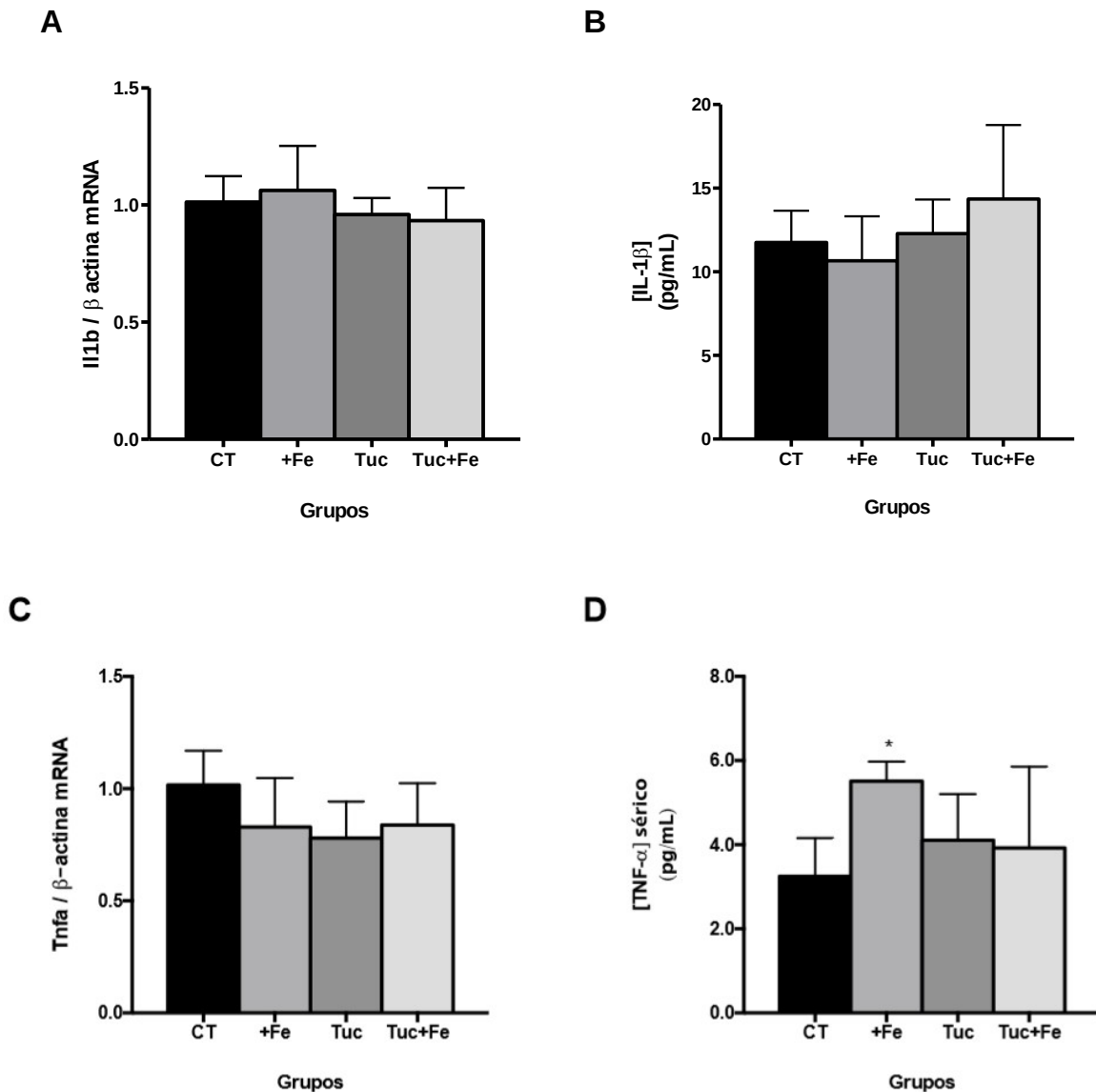


Figura 3. Níveis de marcadores de inflamação em ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado. (A) mRNA hepático de Il1b, (B) níveis séricos de IL-1 β , (C) mRNA hepático de Tnfa e (D) níveis séricos de TNF- α . *Diferença estatística em relação ao grupo CT.

Outra proteína envolvida na modulação da hepcidina pela via da inflamação é o fator de transcrição STAT3 (Sinal Transdutor e Ativador da Transcrição 3). O STAT3 é uma proteína da família das STATs, que consistem em fatores de transcrição que são ativados em resposta a várias citocinas. Sob condições de inflamação, esta proteína, quando fosforilada migra para o núcleo da célula promovendo a transcrição de Hamp (ZHONG et al, 1994; LEVY et al, 2002; ANDREWS et al, 2006).

No presente estudo observou-se que no grupo dos animais suplementados com ferro (+Fe) os níveis de pSTAT3 foram maiores que os do grupo controle ($p = 0,002$), enquanto que o tratamento dietético com Tucum-do-Cerrado associado à suplementação de ferro (Tuc+Fe) diminuiu os níveis de pSTAT3 em relação ao grupo ferro ($p = 0,001$; Figura 4), e tornou os níveis semelhantes ao observado no grupo controle. Estudos recentes com tratamentos de extrato de semente de soja preta (MU et al, 2014) que também observaram inibição da transcrição do gene da hepcidina em camundongos, verificaram menor fosforilação de fatores de transcrição relacionados à ativação de hepcidina, dentre esses o pSTAT3. Desse modo, os resultados do presente estudo sugerem que a inibição da expressão do gene da hepcidina no grupo que consumiu Tucum-do-cerrado associado à suplementação de ferro (Tuc+Fe) pode estar associada à diminuição da proteína pSTAT3. O maior nível de inflamação (níveis séricos de TNF- α) observado no grupo +Fe corrobora com o aumento da pSTAT3. No entanto, não se observou o mesmo resultado no consumo isolado de Tucum-do-cerrado, sugerindo que neste caso, outra via de sinalização possa estar envolvida na inibição da transcrição de hepcidina.

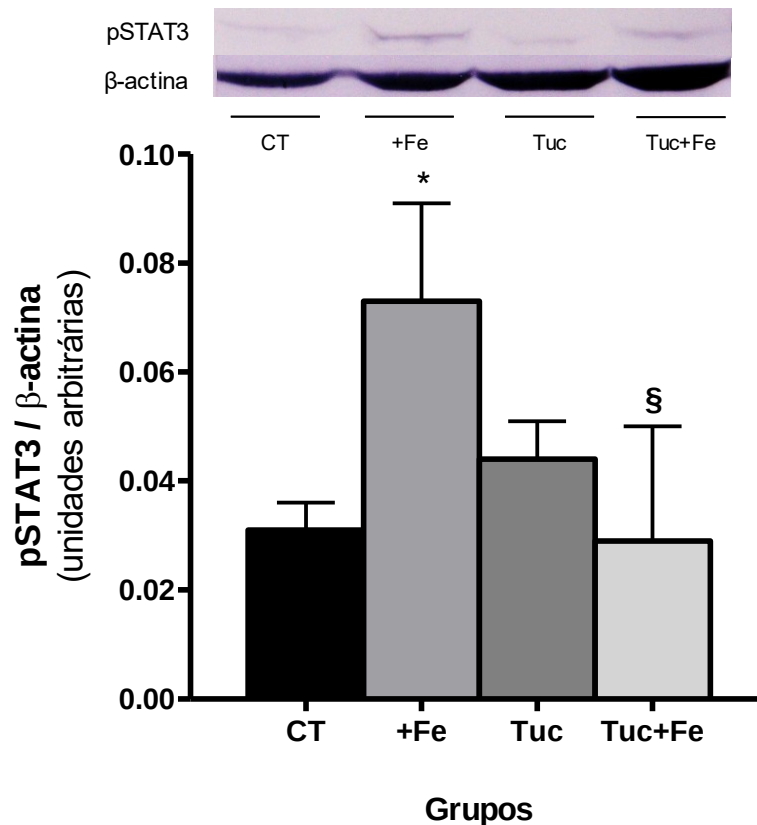


Figura 4. Níveis da proteína pSTAT3 no fígado de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado pela técnica de Western Blotting. *Diferença estatística em relação ao grupo CT. § Diferença estatística em relação ao grupo +Fe.

A hepcidina também pode ser modulada pelo processo de eritropoiese. Nas situações em que a eritropoiese está estimulada a demanda por ferro encontra-se aumentada, portanto a transcrição de Hamp é inibida para que o ferro seja liberado das células para produção de eritrócitos (GAMMELLA et al, 2015). No presente estudo, os níveis renais de transcritos de eritropoietina (Epo) diminuíram no grupo suplementado com ferro e no grupo Tucum-do-Cerrado em comparação ao grupo controle ($p = 0,001$ para ambos) (Figura 5). Não tendo sido observadas diferenças no grupo que consumiu Tucum-do-Cerrado associado à suplementação de ferro (Tuc+Fe), em relação ao grupo +Fe.

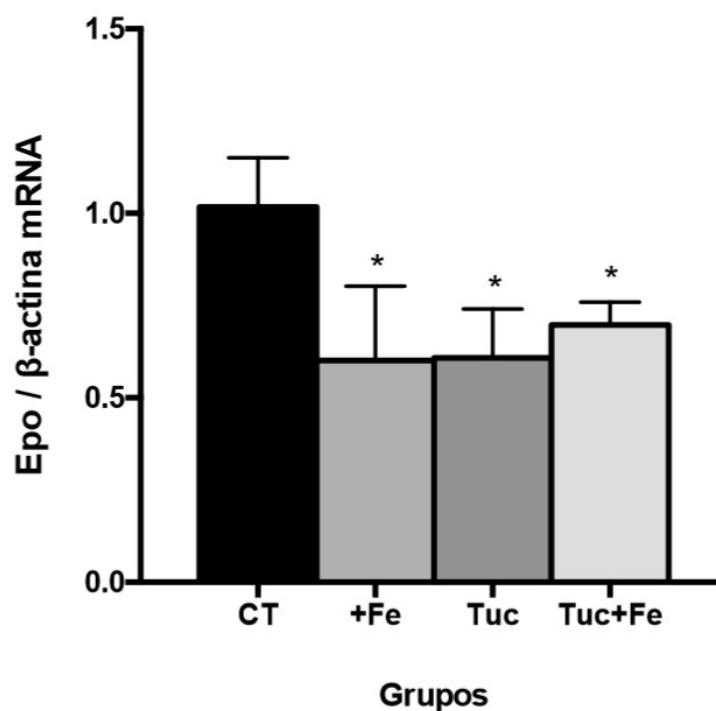


Figura 5. Níveis de transcritos de eritropoietina (Epo) nos rins de ratos suplementados com ferro e/ou Tucum-do-Cerrado. *Diferença estatística em relação ao grupo CT.

No grupo suplementado com ferro (+Fe), sugere-se que os níveis aumentados de Hamp estejam relacionados à diminuição da transcrição de Epo, uma vez que essas duas proteínas apresentam efeitos opostos na regulação do metabolismo de ferro (CAMASCHELLA et al, 2016). Com relação ao consumo de Tucum-do-Cerrado associado à suplementação de ferro (Tuc+Fe) também foi observada diminuição dos níveis de mRNA renal de Epo em relação grupo controle ($p = 0,005$). Embora os níveis de transcritos de Hamp estejam diminuídos no tratamento dietético com Tucum-do-Cerrado (Tuc), neste grupo os níveis de Epo também se encontram reduzidos, sugerindo que haja um outro mecanismo de inibição Hamp quando há consumo isolado do Tucum-do-Cerrado, revelando a necessidade de estudos que elucidem o efeito do Tucum-do-Cerrado na eritropoiese.

4. CONCLUSÃO

O consumo de Tucum-do-Cerrado inibiu a expressão de hepcidina hepática em ratos suplementados ou não com ferro. A indução da expressão Hamp hepática nos ratos suplementados com ferro parece ser mediada pela via inflamatória STAT3/pSTAT3, sendo que consumo de Tucum-do-Cerrado é capaz de inibir parcialmente essa via.

No entanto, em ratos tratados com dieta normal em ferro a inibição da expressão de hepcidina pelo consumo de Tucum-do-Cerrado parece não ser mediada pela via inflamatória STAT3/pSTAT3 e pela via da eritropoietina.

Os resultados sugerem que o Tucum-do-Cerrado possa auxiliar no tratamento de doenças associadas ao excesso de ferro, como a anemia da doença crônica.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, G. J. et al. Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals*, v. 20, n. 3-4, p. 665-74, 2007.
- ANDREWS, N. C.; WRIGHTING, D. M. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. **Blood**, V. 108, n. 9. 2006
- AZEVEDO, M. O. et al. **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2010.
- BACCAN, M. M., CHIARELLI-NETO, O., PEREIRA, R. M. S., BRENO PANNIA ESPÓSITO, B. P. (2012): Quercetin as a shuttle for labile iron. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 107: 34–39.
- BARANOWSKA, I.; CZERNICKI, K.; ALEKSANDROWICZ, R. The analysis of lead, cádmium, zinc, copper and nickel contente in human bonés from the upper Silesian industrial district. **Sci Total Environ**, v. 159, n. 2-3, p. 155-62, 1995.
- BRASIL. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica., 2008. 210 p.
- CAMASCHELLA, C., PAGANI, A., NAI, A., & SILVESTRI, L. The mutual control of iron and erythropoiesis. *International Journal of Laboratory Hematology*, v. 38, p. 20-26, 2016
- CUPPARI, L. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar. **Nutrição clínica no adulto**. Ed. Manole. 406p. 2002.
- DONGIOVANNI et al. Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance. [Am J Pathol](#). 2013 Jun;182(6):2254-63. doi:10.1016/j.ajpath.2013.02.019. Epub 2013 Apr 8.
- EVSTATIEV, R.; GASCHÉ, C. Iron sensing and signalling. **Gut**, v. 61, n. 6, p. 933-52, 2012.
- FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**. Ano IV. Nº2. 2007.
- FUSTINONI-REIS, A. M.; ARRUDA, S. F.; DOURADO, L. P. S.; CUNHA, M. S. B. SIQUEIRA, E. M. A. Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) Consumption Modulates Iron Homeostasis and Prevents Iron-Induced Oxidative Stress in the Rat Liver. **Nutrients** 2016, 8, 38; doi:10.3390/nu8020038.
- GAMMELLA E.; DIAZ V.; RECALCATI S.; BURATTI P.; SAMAJA M.; DEY S.; NOGUCHI C.T.; GASSMANN M.; CAIRO G. Erythropoietin's inhibiting impact on

hepcidin expression. occurs indirectly. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2015 15;308(4):R330-5.

GAO, W.; LI, X.; M GAO, Z.; LI, H. **Iron Increases Diabetes-Induced Kidney Injury and Oxidative Stress in Rats.** *Biol Trace Elem Res* (2014) 160:368–375

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** 2008; 30(5): 390-397.

HAASE, V. H.; NISS, K. DAVIDOFF, O.; LIU, Q. Hypoxia-inducible fator regulates hepcidina via erythropoietin-induced erythropoiesis. **The Journal of Clinical Investigation.** 2012. v 122, n. 12.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem,** v. 48, n. 2, p. 422-7, 1972.

HENTZE, M. W. et al. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell,* v. 142, n. 1, p. 24-38, 2010.

KAUNTZ, H. et al. Silibinin, a natural flavonoid, modulates the early expression of hemoprevention biomarkers in a preclinical model of colon carcinogenesis. **Int J Oncol,** v. 41, n. 3, p. 849-54, 2012.

KIM, J. et al. Chemopreventive effect of cactus (**Opuntia humifusa**) extracts: radical scavenging activity, pro-apoptosis, and anti-inflammatory effect in human colon (SW480) and breast cancer (MCF7) cells. **Food Funct,** v. 30, n. 4, issue 5, p. 681-8, 2013.

LEMOES, A. R.; ISMAEL, L. A. S.; BOATO, C. C. M.; BORGES, M. T. F.; RONDÓ, P. H. C. A hepcidina como parâmetro bioquímico na avaliação da anemia por deficiência de ferro. **Rev Assoc Med Bras** São Paulo, 2010; 56(5): 596-9.

LEVY, D. E.; LEE, C. K. What does Stat3 do? **J. Clin. Invest.** 109, 1143 – 1148. 2002.

LIU, R. H. Dietary bioactive compounds and their health implications. **J Food Sci,** v. 78 Suppl 1, p. A18-25, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Method.** *Methods,* v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

MU, M.; WU, A.; AN, P.; DU, X.; WU, Q.; SHEN, X.; WANG, F. Black soyabean seed coat extract regulates iron metabolism by inhibiting the expression of hepcidin. **British Journal of Nutrition.** N1181-1189. 2014.

NEMETH, E, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004;306(5704):2090–2093.

PANTOPOULOS, K. WANG, J. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochem J**, v. 434, n. 3, p. 365-81, 2011.

PAPANASTASIOU, D. A.; VAYENAS, D. V.; VASSILOPOULOS, A.; REPANTI, M. Concentration of iron and distribution of iron and transferrin after experimental iron overload in rat tissues in vivo: Study of the liver, the spleen, the central nervous system and other organs. **Pathol. Res. Pract.** 196: 47-54. 2000.

PINTO, J. P.; DIAS, V.; ZOLLER, H.; PORTO, G.; CARMO, H.; CARVALHO, F.; SOUSA, M. Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes. **Immunology**. 2010 Jun; 130(2): 217–230.

PORTO, Graça; OLIVEIRA, Susana; PINTO, Jorge Pereira. Hepcidina: A Molécula-Chave na Regulação do Metabolismo do Ferro. **J Port Gastreterol.**, Lisboa , v. 19, n. 1, p. 26-32, jan. 2012 . Disponível em <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0872-81782012000100005&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 18 nov. 2016.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C.. JR. AIN-93G purified diets for laboratory rodents: final reports of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n.11, p. 1939-51, 1993.

ROSA, F. R.; ARRUDA, A. F.; SIQUEIRA, E. M. A; ARRUDA, S. F.. Phytochemical Compounds and Antioxidant Capacity of Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart), Brazil's Native Fruit. **Nutrients** 2016, 8, 110; doi:10.3390/nu8030110.

SHANMUGAN, N. K. N.; CHEN, K.; CHERAYIL, B. J. Commensal Bacteria-induced Interleukin 1 β (IL-1 β) Secreted by Macrophages Up-regulates Hepcidin Expression in Hepatocytes by Activating the Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 290. n. 51. 2015.

SHILS, Maurice E.; Olson, James A.; Shike, Moshe ; Ross, A Catharine; Caballero, Benjamin; Cous, *et al.* Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença. 10ª Ed. São Paulo: **Manole**, 2009. 2256 p.

SIQUEIRA, E. M. A.; MARIN, A. M. F.; DA CUNHA, M. S. B.; FUSTINONI, A. M.; SANT'ANA, L. P.; ARRUDA, S. F. Consumption of baru seeds [*Dipteryx alata* Vog.], a Brazilian savanna nut, prevents iron-induced oxidative stress in rats. **Food Research International** v. 45, p. 427–433, 2012.

SIQUEIRA, E. M. A. et al. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72826, 2013.

SCHUELTER BOEING, J., RIBEIRO, D., CAMPOS CHISTÉ, R., VERGÍLIO VISENTAINER, J., MARISA COSTA, V., FREITAS, M., FERNANDES, E., Chemical

characterization and protective effect of the *Bactris setosa* Mart. fruit against oxidative/nitrosative stress, *Food Chemistry* (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.188>

TANNO, T.; PORAYETTE, P.; SRIPICHA, O.; et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. **Blood** 114:181e6, 2009.

VITALE, Rodrigo Faller; RIBEIRO, Fernando de Andrade Quintanilha. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo , v. 73, n. 1, p. 123-127, Feb. 2007 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992007000100020&lng=en&nrm=iso>.access on 18 Nov. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992007000100020>

ZHANG, A. ZHAO, N. ENNS, C. A. Iron regulation by hepcidin. **J Clin Invest.** 2013;123(6):2337–2343. doi:10.1172/JCI67225

ZHANG, A. Control of Systemic Iron Homeostasis by the Hemojuvelin-Hepcidin Axis. **American Society for Nutrition.** Adv. Nutr. 1: 38–45, 2010; doi:10.3945/an.110.1009.

ZHANG, Y. LI, M. M.; ZENG, F.; YAO, C.; WANG, K. P. Study to establish the role of JAK2 and SMAD158 pathways in the inhibition of hepcidin by polyssacharides from *Angelica sinensis*. **Journal of ethnopharmacology.** 2012. 433-444.

ZHONG, Z.; WEN, Z.; DARNELL JR, J. E. Stat3: A STAT Family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin – 6. **Science.** v. 264, 1994.